

**PENILAIAN HEPATOPROTEKTIF EKSTRAK KLOOROFORM
Phyllanthus pulcher Wall. ex Müll. Arg. DAN PENYISIHAN
FLAVONOID DARIPADA EKSTRAK METANOLNYA
BERDASARKAN AKTIVITI PENYINGKIRAN RADIKAL BEBAS**

LOH SUH IN

UNIVERSITI SAINS MALAYSIA

2007

**PENILAIAN HEPATOPROTEKTIF EKSTRAK KLOOROFORM
Phyllanthus pulcher Wall. ex Müll. Arg. DAN PENYISIHAN
FLAVONOID DARIPADA EKSTRAK METANOLNYA
BERDASARKAN AKTIVITI PENYINGKIRAN RADIKAL BEBAS**

oleh

LOH SUH IN

**Tesis yang diserahkan untuk
memenuhi keperluan bagi Ijazah
Sarjana Sains**

September 2007

**FACTS ARE THE AIR OF SCIENTISTS,
WITHOUT THEM YOU CAN NEVER FLY.**

- LINUS PAULING -

PENGHARGAAN

Dengan nasihat, bimbingan, tunjuk ajar dan segala-galanya yang saya terima, saya amat bersyukur kerana mendapat Prof. Madya Dr. Shaida Fariza Sulaiman sebagai penyelia utama saya sepanjang lebih kurang tiga tahun pengajian Sarjana ini disempurnakan. Jutaan, oh tidak, tak terhingga kata “terima kasih” saya ingin ucapkan kepada beliau...

“Dr, THANK YOU VERY MUCH !! ” (x α)

Setinggi-tinggi penghargaan dan terima kasih juga diucapkan kepada penyelia bersama Prof. Madya Dr. Tengku Sifzizul Tengku Muhammad dan Prof. Madya Dr. Munavvar Zubaid Abdul Satar yang banyak memberikan bimbingan dan nasihat.

Saya bersyukur dan berterima kasih kepada USM, Dekan Pusat Pengajian Sains Kajihayat dan Dekan Institut Pengajian Siswazah yang memberi peluang dan membenarkan saya mengikuti pengajian dan pembiayaan pengajian (GA) saya.

Dengan bantuan yang tak terkira saya terima, ribuan terima kasih ingin disampaikan kepada:

En. Adenan, En. Yusof dan En. Hamid dari Rumah Haiwan,
En. Bakar dan Cik Shantini dari Makmal Histologi,
En. Johari dari Unit Mikroskopi,
En. Shanmugan dari Herbarium Unit,
En. Fisal dan En. Tan dari Makmal HPLC, P.P.S. Farmasi,
En. Ariffin dari Makmal Spektrum UV-Vis, P.P.S. Kimia serta
Dr. Nizam dan En. Rahim dari Makmal LCMS, P. Penyelidikan Dadah & Ubat-ubatan.

Bagi keluarga saya yang sentiasa memahami dan menyokong, saya bersyukur dan berterima kasih. Demi kalian, saya akan terus berusaha!!

Buat teman dan ‘partner’ yang paling best selama 7-8 tahun ini: Kueh さん, 色々お世話になって, 本当にありがとうね! Tidak dilupakan, teman-teman “*under one roof*” dulu, Yeo さん, Shean Yen, Yen Sia, CCC, Hui Mian dan Goik Ching. Gang saya yang lain, Lin Lin, Bee Yong, Cheah Wee dan Poh Ching... *thanks for sharing all the happiness and bitterness with me...* 皆さん, ありがとう!

Marisa, Fidah, Rozi, June dan Tini yang merupakan kawan-kawan seperjuangan yang tabah! Semoga kita semua berjaya pada masa depan! Lupakanlah perkataan “sepuruh” dan “duru”!!

Warga lain dari Lab 106 dan 218, terima kasih di atas bantuan dan bimbingan yang diberikan.

Mr. Tito, guru saya yang mengajar menangkap, menyuntik dan membunuh mencit, *thank you very much*. Warga Lab Farmafisiologi yang lain, *thanks and I miss the smell of the “rat’s BBQ”!*

Terima kasih juga ditujukan kepada kawan baik yang jauh di mata, Kheng Hong yang sentiasa memberi dorongan.

Kepada pihak-pihak lain yang terlibat secara langsung atau tidak langsung ke atas pengajian saya selama ini, jasa kalian tidak akan saya lupakan.

Akhir sekali, kepada mencit-mencit yang telah dikorbankan demi SAINS, *Sadhu! Sadhu! Sadhu!*

TERIMA KASIH!

Loh Suh In

2007

KANDUNGAN

MUKA SURAT

PENGHARGAAN	iii
SUSUNAN KANDUNGAN	v
SENARAI JADUAL	ix
SENARAI RAJAH	x
SENARAI PLAT	xi
SENARAI SINGKATAN	xii
ABSTRAK	xiii
ABSTRACT	xv
BAB 1 PENGENALAN	
1.1 TUMBUHAN UBATAN TRADISIONAL	1
1.2 GENUS <i>Phyllanthus</i>	3
1.3 <i>Phyllanthus pulcher</i> Wall. ex Müll. Arg.	6
1.4 PENYELIDIKAN AWAL MENGENAI <i>P. pulcher</i>	8
1.5 OBJEKTIF PENYELIDIKAN	10
BAB 2 TINJAUAN BACAAN	
2.1 KETOKSIKAN	
2.1.1 TOKSIKOLOGI	12
2.1.2 KAJIAN TOKSIKOLOGI	14
2.2 HEPATOTOKSISITI DAN HEPATOPROTEKTIF	
2.2.1 HATI DAN FUNGSINYA	16
2.2.2 HEPATOTOKSISITI	19
2.2.3 HEPATOPROTEKTIF	21
2.3 ANTIOKSIDA	
2.3.1 PENGOKSIDAAN DAN RADIKAL BEBAS	23
2.3.2 PENYAKIT-PENYAKIT AKIBAT PENGOKSIDAAN DALAM MANUSIA	26
2.3.3 ANTIOKSIDA	29
BAB 3 BAHAN DAN KAEDAH	
3.1 PENYEDIAAN EKSTRAK TUMBUHAN	
3.1.1 PENSAMPELAN DAN PENGEKSTRAKAN	33
3.1.2 PENCAIRAN	34

3.1.2.1	UNTUK KAJIAN SITOTOKSIK	35
3.1.2.2	UNTUK KETOKSIKAN AKUT	35
3.1.2.3	UNTUK KETOKSIKAN SUB-AKUT	35
3.1.2.4	UNTUK HEPATOPROTEKTIF	35
3.1.2.5	UNTUK PENYARINGAN ANTIOKSIDAN DENGAN RADIKAL BEBAS DPPH	36
3.1.2.6	UNTUK MENENTUKAN EC ₅₀ EKSTRAK METANOL, FRAKSI F5-C, SUBFRAKSI F5-CAII DAN FLAVONOL LAIN	36
3.2	KAJIAN SITOTOKSIK TERHADAP SEL HEPG2 SECARA <i>IN VITRO</i>	
3.2.1	KULTUR SEL	36
3.2.2	PEMPLATAN DAN PENGAWETAN SEL	37
3.2.3	PENGUJIAN EKSTRAK PADA SEL	38
3.2.4	ASAI METILINA BIRU	39
3.2.5	PENGIRAAN DAN STATISTIK	39
3.3	KAJIAN KETOKSIKAN DAN HEPATOPROTEKTIF SECARA <i>IN-VIVO</i>	
3.3.1	HAIWAN UNTUK KAJIAN	40
3.3.2	KETOKSIKAN AKUT	
3.3.2.1	PROSEDUR EKSPERIMEN	40
3.3.2.2	PENGIRAAN DAN STATISTIK	41
3.3.3	KETOKSIKAN SUB-AKUT	
3.3.3.1	PROSEDUR EKSPERIMEN	41
3.3.3.2	BERAT BADAN DAN BERAT ORGAN	42
3.3.3.3	PENGIRAAN DAN STATISTIK	42
3.3.4	HEPATOPROTEKTIF	
3.3.4.1	PROSEDUR EKSPERIMEN	43
3.3.4.2	PENGAMBILAN SAMPEL DARAH	44
3.3.4.3	PENGAMBILAN SAMPEL HATI	46
3.3.4.4	KAJIAN BIOKIMIA	46
3.3.4.5	PENGIRAAN DAN STATISTIK	47
3.3.4.6	KAJIAN HISTOPATOLOGI	48
3.4	ANTIOKSIDA	
3.4.1	AKTIVITI PENYINGKIRAN DPPH BAGI SEMUA EKSTRAK	51
3.4.2	<i>DOT-BLOT</i> DAN PENCELUPAN DPPH BAGI SEMUA EKSTRAK	52
3.4.3	PENYISIHAN SECARA KROMATOGRAFI DUA DIMENSI	54
3.4.4	PENCELUPAN DPPH BAGI PLAT TLC SELULOSA KROMATOGRAFI DUA DIMENSI	56
3.4.5	PENYISIHAN EKSTRAK METANOL	56

3.4.6	AKTIVITI PENYINGKIRAN DPPH BAGI SEMUA FRAKSI METANOL	58
3.4.7	PENYISIHAN FRAKSI F5	59
3.4.8	AKTIVITI PENYINGKIRAN DPPH BAGI SEMUA SISIHAN F5	59
3.4.9	KROMATOGRAFI LAPISAN NIPIS	59
3.4.10	HIDROLISIS F5-C (CAMPURAN SISIHAN F5-6, F5-7 DAN F5-8)	61
3.4.11	AKTIVITI PENYINGKIRAN DPPH BAGI FRAKSI F5-CA	61
3.4.12	PENYISIHAN FRAKSI F5-CA	61
3.4.13	AKTIVITI PENYINGKIRAN DPPH BAGI SUBFRAKSI F5-CA	62
3.4.14	KROMATOGRAFI LAPISAN NIPIS UNTUK SUBFRAKSI F5-CAII	62
3.4.15	SPEKTRUM UV CAHAYA TERNAHPAK	62
3.4.16	KROMATOGRAFI CECAIR-SPEKTROMETRI JISIM (LC-MS)	63
3.4.17	KROMATOGRAFI LAPISAN NIPIS BAGI MEMBANDINGKAN KAEMFEROL DAN F5-CAII	63
3.4.18	UNTUK MENENTUKAN EC ₅₀ EKSTRAK METANOL, FRAKSI F5-C, SUBFRAKSI F5-CAII DAN FLAVONOL LAIN	64

BAB 4 KEPUTUSAN

4.1	PENYARINGAN AKTIVITI KESITOTOKSIKAN EKSTRAK SECARA <i>IN VITRO</i>	65
4.2	KAJIAN KETOKSIKAN EKSTRAK KLOOROFORM SECARA <i>IN VIVO</i>	
4.2.1	KETOKSIKAN AKUT	67
4.2.2	KETOKSIKAN SUB-AKUT	
4.2.2.1	BERAT BADAN	69
4.2.2.2	BERAT ORGAN RELATIF	71
4.3	HEPATOPROTEKTIF	75
4.3.1	KAJIAN BIOKIMIA	75
4.3.2	BERAT HATI RELATIF	78
4.3.3	KAJIAN HISTOPATOLOGI	80
4.4	ANTIOKSIDA	
4.4.1	AKTIVITI PENYINGKIRAN DPPH	85
4.4.2	<i>DOT-BLOT</i> DAN PENCELUPAN DPPH	88
4.4.3	PENYISIHAN SECARA KROMATOGRAFI DUA DIMENSI DAN PENCELUPAN DPPH	89
4.4.4	PENYISIHAN EKSTRAK METANOL DAN AKTIVITI PENYINGKIRAN DPPH	92
4.4.5	PENYISIHAN FRAKSI F5 DAN AKTIVITI PENYINGKIRAN DPPH	95
4.4.6	KROMATOGRAFI LAPISAN NIPIS	98
4.4.7	AKTIVITI PENYINGKIRAN DPPH BAGI AGLIKON F5-C (F5-CA)	103

4.4.8	AKTIVITI PENYINGKIRAN DPPH BAGI SUBFRAKSI F5-CA	103
4.4.9	KROMATOGRAFI LAPISAN NIPIS UNTUK SUBFRAKSI F5-CAII	107
4.4.10	SPEKTRUM UV CAHAYA TERNAHPAK	107
4.4.11	KROMATOGRAFI CECAIR-SPEKTROMETRI JISIM (LC-MS)	111
4.4.12	KROMATOGRAFI LAPISAN NIPIS UNTUK KAEMFEROL	111
4.4.13	PENENTUAN SEBATIAN SUBFRAKSI F5-CAII SECARA TENTATIF	113
4.4.14	PENENTUAN EC ₅₀ SUBFRAKSI F5-CAII, EKSTRAK METANOL, FRAKSI F5-C DAN FLAVONOL LAIN	114
 BAB 5 PERBINCANGAN		
5.1	KAJIAN KESITOTOKSIKAN TERHADAP HEPG2	117
5.2	KAJIAN KETOKSIKAN	117
5.3	HEPATOPROTEKTIF	123
5.4	ANTIOKSIDA	130
 KESIMPULAN		138
RUJUKAN		139
LAMPIRAN		167
PENERBITAN		173

SENARAI JADUAL

MUKA SURAT

1.1 Kajian-kajian saintifik bagi beberapa spesies <i>Phyllanthus</i>	5
2.1 Fungsi organ hati manusia	18
3.1 Reka bentuk eksperimen bagi setiap kumpulan dalam kajian hepatoprotektif	45
3.2 Ringkasan cara-cara penyediaan setiap langkah histopatologi	49
4.1 EC ₅₀ bagi semua ekstrak <i>P. pulcher</i> dalam kajian kesitotoksikan	66
4.2 Peratus mortaliti dalam setiap kumpulan dan nilai LD ₅₀ bagi ketoksikan akut	68
4.3 Berat organ relatif telah diselaraskan kepada 100 g berat badan mencit	72
4.4 Berat hati relatif kepada 100 g berat badan mencit	79
4.5 Warna dan relatif pergerakan bagi setiap tompok dan penanda yang kelihatan pada plat TLC selulosa selepas dikromatografikan secara dua dimensi	91
4.6 Kelajuan tindak balas dan intensiti warna setiap tompok pada plat TLC selulosa selepas pencelupan DPPH	92
4.7 Warna dan pergerakan relatif (Rf) fraksi-fraksi ekstrak metanol	94
4.8 Warna dan pergerakan relatif (Rf) bagi setiap sisihan F5	96
4.9 Warna dan pergerakan relatif (Rf) bagi sisihan F-5-6, F5-7 dan F5-8 dengan lima pelarut pada plat TLC selulosa	100
4.10 Warna dan pergerakan relatif (Rf) bagi setiap subfraksi F5-CA	105
4.11 Warna dan pergerakan relatif (Rf) bagi tompok subfraksi F5-CAII dalam kelima-lima pelarut	107
4.12 Ujian pergerakan spektrum: kesan spektrum dan struktur diagnosis setelah penambahan reagen-reagen kepada subfraksi F5-CAII	110
4.13 Warna dan pergerakan relatif (Rf) bagi kaemferol dan subfraksi F5-CAII dalam pelarut-pelarut yang berlainan	111

SENARAI RAJAH

MUKA SURAT

1.1 Carta alir penyelidikan	11
2.1 Hubungan kait dos-rangsangan yang biasa bagi sesuatu bahan (kimia)	13
3.1 Alat pengekstrakan soxhlet	34
3.2 Reka bentuk eksperimen untuk ujian <i>dot-blot</i> dan kecelupan DPPH	53
3.3 Skema penyediaan kertas kromatografi dua dimensi	55
3.4 Skema kromatografi kertas sebelum dan semasa kromatografi dijalankan	57
3.5 Skema cara fraksi dibasuh keluar dan dikumpul secara kromatografi menurun	58
3.6 Skema penyediaan plat TLC selulosa	60
4.1 Graf lengkung-lengkuk peratus bagi semua ekstrak <i>P. pulcher</i> terhadap perencatan sel HepG2 untuk memperolehi EC ₅₀	66
4.2 Berat badan permulaan dan akhir kajian bagi jantina yang berlainan setiap kumpulan ketoksikan sub-akut	70
4.3 Graf-graf paras enzim hati ALT (a) dan AST (b) bagi kajian hepatoprotektif	76
4.4 Graf menunjukkan peratusan penyingkiran DPPH bagi semua ekstrak dan kuersetin	87
4.5 Skema plat TLC selulosa dengan lima tompok kelihatan selepas dikromatografikan dengan pelarut BAW diikuti asid asetik 15% (i/i)	90
4.6 Peratus penyingkiran DPPH bagi semua fraksi ekstrak metanol pada masa pengeraman yang berlainan	95
4.7 Peratus penyingkiran DPPH bagi dua belas sisihan fraksi F5 pada masa pengeraman yang berlainan	98
4.8 Peratus penyingkiran DPPH bagi aglikon F5-CA pada masa pengeraman yang berlainan	104
4.9 Peratus penyisihan DPPH bagi subfraksi F5-CAI, F5-CAII dan F5-CAIII pada masa pengeraman yang berlainan	106
4.10 Anjakan spektrum dari spektrum UV cahaya ternampak bagi subfraksi F5-CAII dengan penambahan beberapa reagen	109
4.11 Kromatogram dan spektrum LC-MS bagi subfraksi F5-CAII	112
4.12 Struktur subfraksi F5-CAII	114
4.13 Graf dan EC ₅₀ bagi ekstrak metanol, fraksi F5-C, subfraksi F5-CAII dan flavonol lain (kaemferol, kuersetin dan mirisetin)	116
5.1 Struktur radikal bebas dan bukan radikal bebas DPPH	132
5.2 Struktur-struktur sebatian utama bagi enam kelas flavonoid	134

SENARAI PLAT

MUKA SURAT

1.1 Pokok <i>Phyllanthus pulcher</i>	7
4.1 Gambar mikroskopi keratan rentas hati Kumpulan 1 (kawalan dengan Tween-80 sahaja)	80
4.2 Gambar mikroskopi keratan rentas hati Kumpulan 2 (ekstrak dengan dos 2.5 mg/kg bb sahaja)	80
4.3 Gambar mikroskopi keratan rentas hati Kumpulan 3 (ekstrak dengan dos 5 mg/kg bb sahaja)	81
4.4 Gambar mikroskopi keratan rentas hati Kumpulan 4 (ekstrak dengan dos 10 mg/kg bb sahaja)	81
4.5 Gambar mikroskopi keratan rentas hati Kumpulan 5 (diberi Tween-80 dan CCl ₄ sahaja)	81
4.6 Gambar mikroskopi keratan rentas hati Kumpulan 6 (Pra-rawatan: ekstrak 2.5 mg/kg bb + CCl ₄)	82
4.7 Gambar mikroskopi keratan rentas hati Kumpulan 7 (Pra-rawatan: ekstrak 5 mg/kg bb + CCl ₄)	82
4.8 Gambar mikroskopi keratan rentas hati Kumpulan 8 (Pra-rawatan: ekstrak 10 mg/kg bb + CCl ₄)	82
4.9 Gambar mikroskopi keratan rentas hati Kumpulan 9 (Pasca-rawatan: ekstrak 2.5 mg/kg bb + CCl ₄ + ekstrak)	83
4.10 Gambar mikroskopi keratan rentas hati Kumpulan 10 (Pasca-rawatan: ekstrak 5 mg/kg bb + CCl ₄ + ekstrak)	83
4.11 Gambar mikroskopi keratan rentas hati Kumpulan 11 (Pasca-rawatan: ekstrak 10 mg/kg bb + CCl ₄ + ekstrak)	83
4.12 Gambar mikroskopi keratan rentas hati Kumpulan 12 (Silimarin 35 mg/kg bb + CCl ₄)	84
4.13 <i>Dot-blot</i> dan pencilupan DPPH bagi semua ekstrak dan kuersetin sebagai kawalan positif	88

SENARAI SINGKATAN

1. LD₅₀ : dos yang membawa 50% kematian
2. CCl₄ : karbon tetraklorida
3. ROS : spesies oksigen reaktif
4. i/i : isipadu per isipadu
5. b/i : berat per isipadu
6. DMSO : dimetil-sulfoksida
7. bb : berat badan
8. EC₅₀ : kepekatan yang berkesan bagi menyingkir 50% daripada radikal DPPH
9. ALT : alanina aminotransferase
10. AST : aspartat aminotransferase
11. H & E : hematoksin dan eosin
12. DPPH : 1, 1-difenil-2-pikrilhidrazil
13. TLC : kromatografi lapisan nipis
14. BAW : butanol-asid asetik-air
15. HOAc : asid asetik
16. UV : ultra lembayung
17. R_f : pergerakan relatif
18. HCl : asid hidroklorik
19. NaOH : natrium hidroksida
20. AlCl₃ : aluminium klorida
21. NaOAc : natrium asetat
22. H₃BO₃ : asid borik
23. LC-MS : kromatografi cecair-spektrometri jisim
24. n : replikat
25. p : kesignifikanan
26. Ca²⁺ : ion kalsium
27. OH : kumpulan hidroksil
28. C : karbon

PENILAIAN HEPATOPROTEKTIF EKSTRAK KLOOROFORM
***Phyllanthus pulcher* Wall. ex Müll. Arg. DAN PENYISIHAN FLAVONOID**
DARIPADA EKSTRAK METANOLNYA BERDASARKAN AKTIVITI
PENYINGKIRAN RADIKAL BEBAS

ABSTRAK

Penyelidikan awal telah menunjukkan aktiviti kesitotoksikan ekstrak kloroform *Phyllanthus pulcher* yang sangat baik terhadap sel hepatoselular karsinoma manusia (HepG2) secara *in vitro*. Maka, kajian lanjut telah dijalankan untuk menentukan keberkesanan hepatoprotektif ekstrak kloroform secara *in vivo* pada mencit yang telah mengalami kerosakan hati akibat teraruh CCl₄. Kajian awal tentang ketoksikan akut dan sub-akut sangat diperlukan bagi menentukan dos yang sesuai bagi kajian hepatoprotektif. Daripada kajian ketoksikan akut, ekstrak dianggap mempunyai ketoksikan yang sederhana dengan LD₅₀ yang agak rendah (119.8 mg/kg berat badan) dan keputusan ini telah mencadangkan kepada penggunaan dos yang lebih rendah dan secara berulang dalam kajian ketoksikan sub-akut yang dikendalikan selama 14 hari. Tiada kesan buruk yang signifikan diperhatikan pada haiwan kajian kecuali penurunan berat badan pada akhir kajian pada mencit-mencit betina kumpulan berdos 5 dan 10 mg/kg bb serta peningkatan berat relatif peparu pada mencit jantan kumpulan berdos 2.5 mg/kg bb. Selain itu, ekstrak kloroform telah menunjukkan kesan perlindungan hati yang sangat baik terhadap kerosakan hati akibat CCl₄. Kumpulan pra-rawatan ekstrak menurunkan secara signifikan paras enzim-enzim hati (ALT dan AST) yang meningkat setelah disuntik dengan CCl₄ pada hari kelima dan keenam dan keputusan ini disokong oleh keputusan dari kajian histologi. Walaubagaimanapun, kumpulan-kumpulan pasca-rawatan ekstrak menunjukkan kesan yang lebih baik dengan menurunkan paras enzim tersebut ke paras yang normal. Kesan hepatoprotektif pasca-rawatan menunjukkan keberkesanan yang sama dengan silimarín yang merupakan kawalan positif. Selain daripada kajian ini, satu kajian *in*

vitro untuk menilai aktiviti antioksidan telah dikendalikan secara berasingan dalam penyelidikan ini. Radikal bebas DPPH telah digunakan untuk menilai aktiviti antioksidan bagi lima ekstrak *P. pulcher*. Ekstrak metanol telah dipilih untuk penyisihan-penyisihan berpandukan bioasai kerana ekstrak ini mempunyai aktiviti penyingkiran yang terbaik. Keputusan ini disokong oleh pemerhatian daripada kajian bukan spektrofotometri. Fraksi F5 (dengan aktiviti penyingkiran sebanyak 86 % pada kepekatan akhir 125 µg/ml) dari penyisihan kali pertama disisihkan untuk mendapat sisihan fraksi F5-6, F5-7 dan F5-8 yang telah mencapai satu skor yang tinggi dalam peratusan penyingkiran (82-85 % pada kepekatan akhir yang sama). Campuran sisihan-sisihan fraksi ini telah dihidrolisis supaya aglikon boleh diperolehi. Aglikon itu terus disisihkan dan aktiviti penyingkiran subfraksi telah dinilai. Akhirnya, subfraksi F5-CAII telah dikenalpasti secara tentatif sebagai kaempferol dan pengenalpastian ini telah disokong oleh keputusan dari spektrofotometri UV-ternapak, LC-MS dan TLC. EC_{50} bagi ekstrak metanol, fraksi F5-C, subfraksi F5-CAII dan flavonol lain (kaempferol, kuersetin dan mirisetin) telah ditentukan. Nilai EC_{50} subfraksi dengan kaempferol atau dengan fraksi F5-C masing-masing adalah sama ($p>0.05$) dan nilai-nilai ini adalah lebih tinggi berbanding dengan nilai bagi kuersetin dan myrisetin. Nilai EC_{50} bagi ekstrak metanol adalah yang tertinggi dalam kajian ini.

HEPATOPROTECTIVE EVALUATION ON CHLOROFORM EXTRACT OF *Phyllanthus pulcher* Wall. ex Müll. Arg. AND FRACTIONATION OF FLAVONOIDS FROM ITS METHANOL EXTRACT BASED ON THE FREE RADICAL SCAVENGING ACTIVITY

ABSTRACT

Preliminary study has shown a strong cytotoxic activity of chloroform extract of *Phyllanthus pulcher* against *in vitro* human hepatocellular carcinoma (HepG2) cell line. Therefore, further investigation on the hepatoprotective effect of the chloroform extract has been carried out on the *in vivo* CCl₄-induced liver damage in mice. The acute and sub-acute toxicological tests were conducted in order to determine the doses for the hepatoprotective study. From the acute toxicity test, the extract was considered having moderately toxicity with a slightly low LD₅₀ (119.8 mg/kg body weight) and the result suggested the use of lower but repeated doses in sub-acute toxicity test which was conducted for 14 days. No significant adverse effects observed from the animals in the test except the decrease of body weight at end of the test on female mice in groups dosed 5 and 10 mg/kg bw and the increase of relative weight of lungs on male mice in group dosed 2.5 mg/kg bw. On the other hand, the chloroform extract has shown very well protective effects on the liver injury induced by CCl₄. Pre-treated groups of extract have significantly decreased the induced level of liver enzymes (ALT and AST) and it is supported by the histological results. Nevertheless, the post-treated groups showed better effect by reducing enzymes level to normal. The hepatoprotection of post-treated groups showed an equivalence effectiveness to silymarin which served as positive control. Meanwhile, an evaluation of *in vitro* antioxidant activity has also been carried out as another part of this study. The free radical DPPH was used to evaluate for the antioxidant property of five extracts of *P. pulcher*. Methanolic extract has been chosen for the bioassay-guided fractionation because it possessed the best scavenging activity. The result was also supported by the observation of non-

spectrophotometry study. Fraction F5 (with 86 % of scavenging activity at the final concentration of 125 µg/ml) from the first fractionation has been separated to get bands of F5-6, F5-7 and F5-8 which possessed a high score of scavenging percentage (82-85 % at the same final concentration). Mixture of those bands was then being hydrolyzed to obtain the aglycone. The aglycones were fractionated and their scavenging activities were assessed. Subfraction of F5-CAII was eventually identified tentatively as kaempferol and the identification was supported by the results from UV-Visible spectrophotometry, LC-MS and TLC. EC₅₀ of methanol extract, fraction F5-C, subfraction F5-CAII and other flavonols (kaempferol, quercetin and myricetin) were determined. EC₅₀ of subfraction and kaempferol or, and fraction F5-C are not differed from each other ($p>0.05$) respectively, and have higher value than that of quercetin and myricetin. EC₅₀ of methanol extract is the highest in this study.

PENGENALAN

1.1 TUMBUHAN UBATAN

Tumbuh-tumbuhan bukan sahaja boleh dijadikan sebagai bahan makanan dan tempat perlindungan kepada manusia dan haiwan, tetapi telah digunakan oleh manusia sebagai bahan bagi merawat pelbagai jenis penyakit sejak beribu tahun yang lalu (Gilani, 2005). Penggunaan dan cara penyediaan tumbuhan ubatan pada masa dahulu telah diturunkan dari satu generasi ke generasi secara lisan. Kini, kebanyakan fungsi dan cara penggunaan tumbuh-tumbuhan ubatan tradisional ini telah dicatatkan dalam pelbagai buku rujukan (Kinghorn, 2001; Samuelsson, 2004).

Pada abad ke-19, sekurang-kurangnya 80 % daripada semua ubat-ubatan di seluruh dunia adalah berasal daripada tumbuhan herba. Revolusi perubatan turut berlaku selepas itu setelah industri farmaseutikal dibangunkan dan kemunculan dadah sintetik. Namun begitu, perubatan tradisional dengan menggunakan tumbuhan herba masih tidak disingkirkan (Gilani, 2005). Pada abad yang sama, terdapat perhubungan yang rapat antara penggunaan tumbuh-tumbuhan ubatan tradisional dengan teknologi perubatan moden apabila ubat mofin berjaya disisihkan daripada pokok candu (*Papaver somniferum*). Penemuan ini telah mendorong lebih banyak penemuan ubat lain yang berasal tumbuhan ubatan tradisional. Selain mofin, ubat-ubat lain seperti kokain, kodeina, digitoksin dan kuinin yang juga disisihkan daripada tumbuhan masih digunakan sehingga sekarang (Newman *et al.*, 2000; Kinghorn, 2001; Samuelsson, 2004; Butler, 2004).

Penyisihan dan pencirian bahan bioaktif daripada tumbuh-tumbuhan ubatan terus giat dijalankan dan dikaitkan dengan aspek farmakologinya (Balunas & Kinghorn, 2005). Mengikut Kamuhabwa dan rakan-rakannya (2000), terdapat pelbagai cara untuk memilih jenis tumbuhan kajian yang berkemungkinan mengandungi sebatian aktif. Salah satu cara adalah dengan menggunakan data ethno-perubatan di mana

tumbuhan dipilih berdasarkan maklumat kegunaan tradisinya. Dengan menggunakan jenis bioasai yang sesuai, penyisihan sebatian biokimia dan pengenalanpastian sebatian yang penting dijalankan.

Kini, dengan teknologi perubatan yang semakin canggih, lebih banyak dadah atau ubat-ubatan sama ada disisihkan daripada tumbuhan ubatan atau secara sintetik telah diperolehi. Taraf kesihatan manusia turut meningkat. Walaubagaimanapun akibat pengamalan hidup dan pemakanan serta unsur-unsur persekitaran yang tidak baik, manusia semakin kerap diserang oleh penyakit seperti kencing manis, tekanan darah tinggi, penyakit kardiovaskular, kanser dan sebagainya. Dengan merujuk kepada data-data ethno-perubatan dan botani, bahan penawar atau penyembuh bagi penyakit-penyakit ini semakin giat dicari. Misalnya kes-kes penyakit kanser semakin meningkat sejak tahun 1990-an dan penyakit ini sering membawa maut kepada manusia (Parkin, 2001). Empat kelas sebatian agen antikanser telah berjaya disisihkan daripada tumbuhan dan sehingga kini masih digunakan dalam rawatan klinikal. Empat kelas agen ini adalah alkaloid vinka (atau *Catharanthus*), epipodofilotoksin, taksana dan kamptotesin. Vinblastina dan vinkristina yang telah berjaya disisihkan daripada *Catharanthus roseus*, juga telah digunakan secara klinikal masing-masing untuk merawat penyakit Hodgkin's (kanser yang menyerang kelenjar limfa, organ limpa dan hati) dan leukemia sejak 40 tahun yang lalu (Dewick, 1997; van Der Heijden *et al.*, 2004).

Gabungan beberapa jenis tumbuhan herba juga telah digunakan untuk merawat sesuatu penyakit. Ramuan yang telah ditetapkan dos dan nisbah campurannya telah terbukti keberkesanannya sejak turun temurun dan masih digunakan secara meluas (Lee *et al.*, 2004a). Untuk membuktikan secara saintifik keberkesanan ramuan herba ini dan sebatian-sebatian bioaktif yang disisihkan, ramai penyelidik telah membuat kajian mengikut fungsi ramuan tersebut bagi menentukan aktiviti dan mekanisme tindakan antikanser, antimalaria, antioksidan, hepatoprotektif dan sebagainya (Efferth *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2002; 2004a; Hu *et al.*, 2004;

Zhang *et al.*, 2004; Qian *et al.*, 2004; Buenz *et al.*, 2005, Lee *et al.*, Yang *et al.*, 2005; Sadasivan *et al.*, 2006).

Menurut kajian Butler (2004), pada tahun 2001 dan 2002 lebih kurang 25 % daripada penjualan jenis dadah terbaik dunia adalah produk semulajadi atau berasal daripada produk semulajadi. Kini, Organisasi Kesihatan Dunia (WHO) pula menyatakan bahawa lebih kurang 75 % daripada jumlah populasi dunia masih bergantung kepada rawatan tradisional (terutamanya penggunaan herba) untuk penjagaan kesihatan (Gilani, 2005). Maka, berdasarkan bukti-bukti yang telah dinyatakan dengan jelasnya membuktikan bahawa tumbuh-tumbuhan ubatan tradisional mempunyai prospek yang lebih luas pada masa akan datang. Penemuan ubat yang lebih baik dan berkesan terhadap segala penyakit akan memberi manfaat kepada manusia di mana taraf kesihatan dapat ditingkatkan dan umur boleh dipanjangkan.

1.2 GENUS *Phyllanthus*

Phyllanthus merupakan salah satu genus yang besar daripada famili Euphorbiaceae. Tumbuh-tumbuhan dalam genus ini merupakan pokok-pokok renek, pokok-pokok atau herba. Daunnya berselang-seli, nipis dan bersaiz kecil atau sederhana. Bunganya kecil, uniseks dan biasanya, tergantung pada aksil daun di sebelah bawah tangkai. Genus *Phyllanthus* tersebar secara meluas di negara tropika dan subtropika (Burkill, 1966; Henderson, 1959). Mengikut kajian Ridley pada tahun 1924, terdapat lebih daripada 300 spesies dalam genus ini. Tetapi, hanya 18 spesies sahaja daripada jumlah itu terdapat di Semenanjung Malaysia (Herderson, 1959). Spesiesnya adalah *P. niruri*, *P. urinaria*, *P. chamaepeuce*, *P. simplex*, *P. maderaspatensis*, *P. pulcher*, *P. filicifolius*, *P. dalbergioides*, *P. erythrocarpus*, *P. reticulatus*, *P. frondosus*, *P. coriaceus*, *P. campanulatus*, *P. elegans*, *P. gracilipes*, *P. hamiltonianus*, *P. hullettii* dan *P. gomphocarpus* (Ridley, 1924).

Antara spesies-spesies genus *Phyllanthus*, terdapat beberapa spesies yang beracun, misalnya *P. indicus* dari Asia Tenggara dan *P. engleri* dari Afrika. Sesetengah ekstrak buah bagi spesies daripada genus ini dijadikan sebagai pewarna (seperti *P. emblica* dan *P. reticulatus*), buah yang boleh dimakan (misalnya, *P. acidus* dan *P. emblica*) dan sebagai pokok hiasan (*P. pulcher* dan *P. myrtifolious*). Pokok *P. acidus*, *P. emblica*, *P. reticulatus* juga boleh digunakan sebagai kayu untuk membuat perkakas rumah atau alat tulis (de Padua *et al.*, 1999). Tumbuh-tumbuhan genus *Phyllanthus* telah digunakan dengan luasnya dalam perubatan kampung di kebanyakan negara sejak beribu tahun dahulu dan digunakan untuk merawat penyakit-penyakit seperti gangguan pada buah pinggang dan pundi kencing, jangkitan usus, kencing manis dan jangkitan hepatitis B virus (Santos *et al.*, 1995; Calixto *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2001). Di India, misalnya, spesies-spesies *Phyllanthus* yang banyak digunakan untuk perubatan kampung adalah seperti *P. niruri*, *P. emblica*, *P. maderaspatensis*, *P. urinaria*, *P. virgatus*, *P. patens* dan sebagainya (Parrotta, 2001).

Kebelakangan ini, minat penyelidik-penyelidik terhadap tumbuh-tumbuhan genus *Phyllanthus* telah kian meningkat terutamanya terhadap potensi-potensi terapeutik genus ini bagi merawat pelbagai jenis penyakit. Mengikut Kumaran dan Karunakaran (2007a) fenomena ini berlaku disebabkan oleh:

- penyebarannya yang meluas di kawasan negara tropika dan subtropika
- bilangan spesies yang banyak dalam genus ini
- penggunaan terapeutik dalam perubatan kampung
- diversiti metabolit sekunder yang hadir pada tumbuh-tumbuhan ini

Kajian-kajian saintifik yang telah dijalankan terhadap beberapa jenis spesies *Phyllanthus* semenjak beberapa tahun ini, telah diringkaskan dalam Jadual 1.1.

Jadual 1.1 Kajian-kajian saintifik bagi beberapa spesies *Phyllanthus*.

Spesies	Aktiviti
<i>Phyllanthus acuminatus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Antibakteria dan antifungal (Goun <i>et al.</i>, 2003)
<i>Phyllanthus amarus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Antinosiseptif (Santos <i>et al.</i>, 2000) • Perencatan lesi gastrik (Raphael & Kuttan, 2003) • Perencatan α-amilase (Ali <i>et al.</i>, 2006) • Antiinflamasi dan antialodinik (Kassuya <i>et al.</i>, 2006) • Antioksida (Kumaran & Karunakaran, 2007a) • Hipoglisemia dan hipokolesterolaemia (Adeneye <i>et al.</i>, 2006)
<i>Phyllanthus debilis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Antioksida (Kumaran & Karunakaran, 2007a)
<i>Phyllanthus emblica</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Hepatoprotektif <i>in vivo</i> (Pramyothin <i>et al.</i>, 2006)
<i>Phyllanthus fraternus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Antinosiseptif (Santos <i>et al.</i>, 2000) • Protektif mitokondria hati (Sailaja & Setty, 2006)
<i>Phyllanthus maderaspatensis</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Antihepatotoksik (Asha <i>et al.</i>, 2004) • Antioksida (Kumaran & Karunakaran, 2007a)
<i>Phyllanthus niruri</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Perendahan lipid aktiviti pada tikus hiperlipemia (Khanna <i>et al.</i>, 2002) • Antioksidan (Ahmeda <i>et al.</i>, 2005; Harish & Shivanandappa, 2006) • Hepatoprotektif <i>in vivo</i> (Harish & Shivanandappa, 2006)
<i>Phyllanthus orbiculatus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Antiviral (del Barrio & Parra, 2000) • Antimutagenesis (Ferrer <i>et al.</i>, 2004)
<i>Phyllanthus oxyphyllus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Antioksida (Sutthivaiyakit <i>et al.</i>, 2003)
<i>Phyllanthus piscatorum</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Antimikrob dan kajian kesitotoksikan (Gertsch <i>et al.</i>, 2004)
<i>Phyllanthus polyphyllus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Antiinflamasi (Rao <i>et al.</i>, 2006)
<i>Phyllanthus sellowianus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Hipoglisemia (Hnatyszyn <i>et al.</i>, 2002)
<i>Phyllanthus tenellus</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Immunomodulatori secara <i>in vivo</i> dan <i>in vitro</i> (Ignacio <i>et al.</i>, 2001)
<i>Phyllanthus urinaria</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Pencetusan apoptosis (Huang <i>et al.</i>, 2003) • Kesan antitumor dan antigliogenik (Huang <i>et al.</i>, 2006) • Antioksida (Kumaran & Karunakaran, 2007a)

1.3 *Phyllanthus pulcher* Wall. ex Müll. Arg.

Phyllanthus pulcher merupakan salah satu spesies *Phyllanthus* yang terdapat di Semenanjung Malaysia. Selain nama tempatannya sebagai Naga Buana, *P. pulcher* juga dikenali sebagai Naga Jumat, Kelurut Tanjung, Nohok Penuduk, Kayu Putih dan Semelit Patung. Ia merupakan tumbuhan renek yang boleh tumbuh setinggi 1.5 meter. Daunnya berbentuk eliptikal atau ovat-eliptikal dengan saiz 0.6-1.9 cm panjang dan 0.6-1.5 cm lebar. Tumbuhan ini mempunyai bunga yang berwarna merah (Ridley, 1924; Henderson, 1959; de Padua *et al.*, 1999; Mat-Salleh & Latiff, 2002).

P. pulcher telah banyak digunakan sebagai tumbuhan ubatan bagi kaum Melayu. Air rebusan daunnya telah digunakan untuk membersihkan mata. Daunnya yang telah ditumbuk lumat juga boleh dituam pada hidung untuk mengubati ulser hidung, ditampal pada bahagian yang berbisul, bengkak bernanah dan gatal-gatal serta disapu pada adomen untuk merawat demam dan masalah buah pinggang pada kanak-kanak. Di samping itu, air rebusan keseluruhan pokok ini boleh diminum bagi mengubati sakit perut dan daunnya yang segar pula boleh ditampal pada gusi untuk merawat sakit gigi. Air rebusan akarnya juga dipercayai dapat menyembuhkan tekanan darah tinggi (Burkill, 1966; Mat-Salleh & Latiff, 2002). Plat 1.1 menunjukkan gambar-gambar *P. pulcher*.



Plat 1.1 Pokok *Phyllanthus pulcher*.

1.4 PENYELIDIKAN AWAL MENGENAI *P. pulcher*

Sehingga kini, tidak banyak kajian telah dijalankan ke atas spesies ini. Kajian yang pernah dikendalikan dengan menggunakan pokok ini adalah untuk mengkaji aktiviti-aktiviti seperti anti HIV-1 RT (anti virus keimunodefisienan manusia-transkripsi berbalik), antimalaria, antioksidasi, anti *Helicobacter pylori* (sejenis bakteria patogen), ketoksikan dan kesitotoksikan.

Menurut Rozaimah (2001), ekstrak *P. pulcher* menunjukkan nilai IC_{50} (median kepekatan perencatan) yang paling baik iaitu 5.884 $\mu\text{g/L}$ berbanding spesies *Phyllanthus* yang lain. Ia berpotensi dijadikan sebagai agen anti HIV-1 RT disebabkan oleh aktiviti yang tinggi. Afiah (2001) pula pernah mengkaji ketoksikan ekstrak metanol *P. pulcher* terhadap udang garam (*Artemia salina*) dan didapati LC_{50} (median kepekatan kematian) ketoksikan akut adalah lebih daripada 5 mg/ml, secara umumnya lebih rendah daripada beberapa spesies *Phyllanthus* yang lain. Tetapi, ekstrak ini menunjukkan ketoksikan kronik yang paling tinggi terhadap jenis udang garam yang sama dan LC_{50} nya hanya 1.65 mg/ml.

Beberapa penyelidik lain telah menggunakan ekstrak bahagian daun pokok ini untuk kajian lain. Kajian aktiviti antimalaria dan antioksidasi yang dijalankan oleh Khairul Farihan (2004) telah mendapati bahawa ekstrak daun *P. pulcher* tidak menunjukkan aktiviti antimalaria yang baik terhadap perkembangan parasitemia dalam darah mencit yang dijangkiti dengan *Plasmodium berghei* berbanding dengan spesies *Phyllanthus* yang lain seperti *P. emblica*, *P. niruri* dan *P. urinaria*. Walaubagaimanapun, ekstrak ini mempunyai aktiviti antioksidasi yang baik dengan menggunakan kajian FTC (Frik Tiosianat) di mana aktiviti yang lebih baik daripada kawalan positif BHT (2, 6-di-tert-butyl-4-metilfenol, bahan antioksidasi sintetik) dan α -tokoferol (bahan antioksidasi semulajadi). Manakala dalam kajian antioksidasi yang menggunakan kaedah TBA (Asid Tiobarbiturik) pula, kesan ekstrak ini juga setanding α -tokoferol.

Ekstrak kloroform daun *P. pulcher* pula menunjukkan aktiviti antimikrob yang baik terhadap bakteria seperti *Helicobacter pylori* dan *Vibrio cholerae* di mana zon

perencatan pada koloni *H. pylori* adalah yang terbesar berbanding antara semua ekstrak dari pelbagai spesies *Phyllanthus* yang lain (Wan Iryani, 2005). Sebelum itu, Zuraihan (2002) telah berjaya menguji pelbagai ekstrak daun spesies-spesies *Phyllanthus* terhadap sel kanser hepatoselular karsinoma manusia, HepG2. Kajian itu menunjukkan bahawa ekstrak kloroform *P. pulcher* mempunyai aktiviti antikanser yang sangat baik terhadap sel turunan HepG2. Mohammad Syaiful Bahari (2004) pula telah menguji ekstrak yang sama terhadap pelbagai jenis sel kanser. Keputusan daripada kajian tersebut juga menunjukkan bahawa ekstrak kloroform mempunyai kesan perencatan yang paling baik terhadap sel HepG2, dengan nilai EC_{50} (median kepekatan perencatan) yang sangat rendah, iaitu 0.919 $\mu\text{g/ml}$. Kajian juga telah membuktikan bahawa sel-sel kanser HepG2 yang dirawat dengan ekstrak kloroform terencat secara apoptosis di mana cara ini merupakan satu cara kematian sel tanpa memecahkan sel dan tanpa menyebabkan kesan sampingan yang tidak diingini berlaku. Mohammad Syaiful Bahari (2004) juga telah menyisihkan ekstrak kloroform, dan didapati aktiviti kesitotoksikan bagi semua sisihan yang diperolehi tidak setanding ekstrak krud setelah diuji terhadap sel HepG2.

1.5 OBJEKTIF PENYELIDIKAN

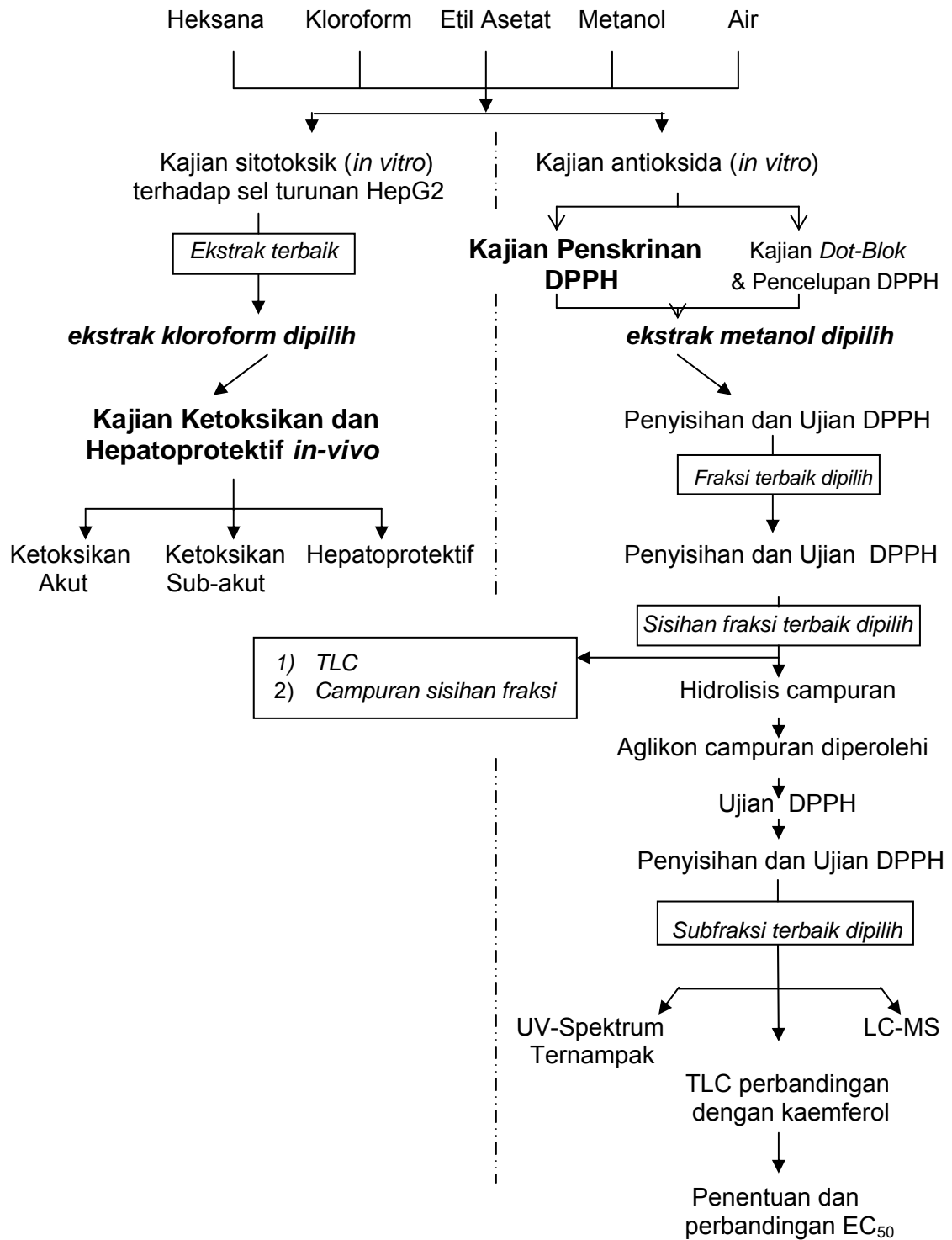
Objektif-objektif utama penyelidikan ini adalah:

1. Untuk menyaring aktiviti sitotoksik lima ekstrak *P. pulcher* secara *in vitro* terhadap sel turunan HepG2.
2. Untuk menentukan ketoksikan akut dan sub-akut secara *in vivo* ekstrak terbaik iaitu ekstrak kloroform terhadap mencit.
3. Untuk menentukan aktiviti hepatoprotektif secara *in vivo* daripada ekstrak kloroform terhadap mencit yang hatinya telah dirosakkan oleh karbon tetraklorida (CCl₄).
4. Untuk menentukan aktiviti antioksidan lima ekstrak *P. pulcher* dengan kaedah penyingkiran radikal bebas, 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH).
5. Untuk menyisih dan mengenalpasti sebatian aktif antioksidan dalam ekstrak terbaik iaitu ekstrak metanol dan kesannya dalam menyingkirkan radikal bebas DPPH.

Carta alir penyelidikan ini telah diringkaskan dalam Rajah 1.1.

Phyllanthus pulcher

Pengekstrakan



Rajah 1.1 Carta alir penyelidikan.

TINJAUAN BACAAN

2.1 KETOKSIKAN

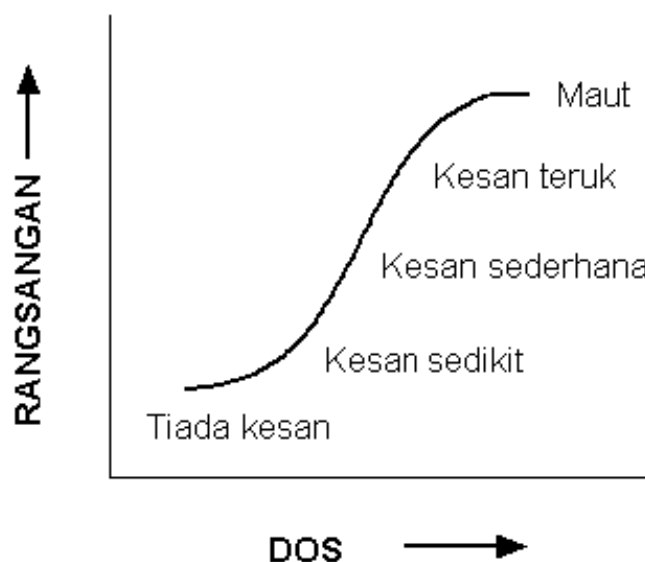
2.1.1 TOKSIKOLOGI

Definisi tradisional bagi toksikologi adalah 'sains racun' (Langman & Kapur, 2006). Kini, toksikologi boleh ditakrifkan lebih spesifik sebagai kewajaran dan mekanisme kesan toksik sesuatu bahan terhadap organisma hidup dan sistem biologi yang lain (Lu, 1996). Toksikologi juga melibatkan ciri-ciri kimia dan fizikal sesuatu racun, kesan terhadap fisiologi atau tingkah laku organisma hidup, kaedah kuantitatif dan kualitatif untuk menganalisis unsur biologi atau bukan biologi dan perkembangan kaedah perawatan racun (Langman & Kapur, 2006).

Manusia zaman silam mengenalpasti sesuatu bahan yang beracun dengan tanda-tanda negatif yang ditunjukkan seperti kesan yang boleh membawa maut atau kesakitan kepada orang lain atau haiwan buruan. Sehingga 1500 Sebelum Masihi, hemlok (sejenis tumbuhan beracun), candu, panah dan bahan logam beracun telah digunakan secara meluas untuk meracun musuh dan membunuh banduan. Pada abad ke-18, manusia mula percaya bahawa minda dan sains, akan membawa kemajuan kepada manusia. Pada masa itulah, beberapa konsep tentang toksikologi telah mula dibentuk (Fenton, 2002).

Sesuatu bahan yang dikenali sebagai racun (atau toksik) jika bahan itu boleh menyebabkan kesakitan atau membawa maut apabila 'kuantiti yang mencukupi' telah diambil (Langman & Kapur, 2006). Pada abad ke-16, Paracelsus (1493-1541) seorang pakar pembedahan yang terkenal telah mengatakan bahawa "Tiada bahan yang merupakan racun dengan sendirinya tetapi dos yang akan menyebabkan bahan itu beracun" dan "Dos yang betul akan membezakan sesuatu bahan itu sama ada beracun atau berubat" (Lu, 1996). Misalnya, air, manusia tidak dapat hidup tanpa air tetapi, jika pengambilan air yang banyak pada satu jangka masa yang pendek, air akan

mengancam dan membahayakan badan (Schiefer *et al.*, 1997). Maka, satu hubungan antara dos dengan rangsangannya telah wujud dan ini merupakan konsep utama bagi bidang toksikologi (Schiefer *et al.*, 1997; Langman & Kapur, 2006). Poklis dan Pesce (1984) pula telah menyatakan bahawa biasanya tiada perbezaan mekanisme antara sesuatu ubat dan sesuatu racun. Sesuatu ubat digunakan pada dos yang akan memulihkan fungsi fisiologi supaya menghasilkan kesan terapeutik yang diinginkan. Jika ianya telah digunakan lebih daripada kuantiti yang diperlukan, sesuatu ubat itu berkemungkinan besar akan menimbulkan kesan yang buruk. Maka, toksikologi juga merupakan satu disiplin kuantitatif bagi mengenalpasti jumlah minimum sesuatu bahan yang akan timbul kesan buruk terhadap individu yang berkaitan setelah didedahkan atau diberi secara internal dan eksternal bahan tersebut (Langman & Kapur, 2006). Rajah 2.1 menunjukkan hubungan kait dos-rangsangan yang umum terhadap sesuatu bahan (kimia).



Rajah 2.1 Hubungan kait dos-rangsangan yang biasa bagi sesuatu bahan (kimia) (Schiefer *et al.*, 1997).

2.1.2 KAJIAN TOKSIKOLOGI

Satu lagi hubungan yang berkaitan dengan dos wujud untuk menjawab soalan 'berapa lama' atau 'berapa kerap' pendedahan sistem biologi tertentu terhadap sesuatu bahan (kimia). Hubungan yang dinyatakan di sini ialah hubungan antara dos dan masa pengendalian. Dalam kajian toksikologi, dos dan masa pengendalian telah membezakan toksikologi kepada dua jenis yang utama iaitu ketoksikan akut dan ketoksikan kronik.

Ketoksikan akut merupakan suatu kajian yang dijalankan untuk menentukan kesan yang buruk yang disebabkan oleh sesuatu bahan dalam satu jangka masa yang terhad. Kesan yang diperhatikan pada organisma kajian biasanya dipengaruhi oleh jumlah bahan uji yang digunakan. Objektif utama kajian ini adalah untuk merekodkan sebarang kesan negatif terhadap organisma kajian (Ecobichon, 1992). Dos kematian dan dos yang merangsang kesan sampingan serta simptom yang dicetuskan juga dapat ditentukan (Balazs, 1970).

Potensi ketoksikan sesuatu bahan boleh diterangkan dengan menggunakan istilah LD₅₀ (median dos kematian) (Ecobichon, 1992). Ianya bermaksud dos kematian 50 % kepada jumlah organisma kajian yang berada di dalam keadaan makmal yang terkawal. LD₅₀ boleh dikira berdasarkan bilangan kematian organisma kajian dalam jangka masa 24 jam setelah dos tunggal atau berulang daripada beberapa julat dos digunakan. Unit bagi LD₅₀ ialah miligram bahan uji per kilogram berat badan organisma kajian (mg/kg bb). Nilai LD₅₀ yang lebih rendah menunjukkan bahan yang diuji itu lebih toksik. Seseengah bahan akan menyebabkan kematian pada dos yang sangat rendah dan seseengah pula tidak menunjukkan sebarang kesan negatif pada dos yang tinggi. Misalnya, toksin botulinum, sejenis bahan toksik yang boleh dijumpai dalam makanan yang basi, yang disebabkan oleh bakteria patogen, *Clostridium botulinum*, LD₅₀nya adalah serendah 0.00001 mg/kg bb. Manakala, LD₅₀ bagi natrium klorida (garam makan), diuji pada jenis haiwan yang sama, adalah setinggi 4000 mg/kg bb (Schiefer *et al.*, 1997).

Satu lagi kajian ketoksikan yang melibatkan pemberian dos pada kekerapan yang berbeza sepanjang kajian dijalankan (dos berulang) memerlukan masa yang lebih panjang daripada ketoksikan akut tetapi tidak melebihi 90 hari. Ia dikenali sebagai ketoksikan sub-akut atau ketoksikan sub-kronik (WHO, 1978). Pelbagai matlumat tentang kesan sampingan bahan ini selain daripada kematian organisma kajian semasa tempoh kajian dapat direkodkan. Kesan-kesan sampingan mungkin berlaku pada organisma kajian adalah seperti perubahan tingkah laku, ciri histologi organ-organ, naik turun komponen-komponen dalam bendalir badan dan sebagainya (Schiefer *et al.*, 1997).

Jenis kajian ketoksikan yang mengambil masa lebih daripada 90 hari adalah ketoksikan kronik. Objektif utama kajian ketoksikan kronik melibatkan pengendalian dos yang rendah tetapi berulang bagi satu jangka masa yang agak panjang bagi menentukan kesan-kesan sampingan sesuatu bahan kajian yang tidak diingini atau membahaya diperolehi (Benitz, 1970). Bahan uji yang digunakan biasanya tidak akan menunjukkan sebarang kesan sehinggalah pengendalian itu telah diterusnyanya selama satu jangka masa yang panjang (Schiefer *et al.*, 1997). Kajian ketoksikan jangka masa yang panjang ini penting untuk membuktikan ketoksikan sesuatu bahan uji setelah ciri-ciri fisiologi dan biokimia organisma kajian berubah berbanding dengan organisma kawalan (Ecobichon, 1992).

Perbezaan antara kajian ketoksikan akut dan kronik daripada segi kesan toksik ialah ketoksikan akut menimbulkan kesan toksik dalam masa yang singkat setelah pemberian tunggal bahan kajian manakala kesan toksik bagi ketoksikan kronik muncul setelah pemberian tunggal atau berulang dikenakan pada organisma kajian selepas satu jangka masa yang panjang (Mückter, 2003). Ketoksikan akut dan kronik bagi bahan yang sama mungkin akan menghasilkan kesan atau simptom yang berlainan dan tidak berkaitan. Contohnya, ketoksikan akut arsenik menunjukkan kesan terutamanya pada saluran penghadaman yang mengakibatkan muntah dan cirit-birit yang teruk. Manakala, keracunan arsenik secara kronik akan menyebabkan

perubahan pada kulit, kerosakan pada hati, saraf dan sistem pembentukan darah (Schiefer *et al.*, 1997). Maka, kesan ketoksikan kronik tidak dapat diramalkan berdasarkan data-data yang diperolehi dari ketoksikan akut dan sub-akut. Ini kerana sesuatu bahan itu mungkin boleh menghasilkan rangsangan toksik yang berlainan apabila diberikan berulang kali pada satu jangka masa yang panjang. Faktor-faktor seperti keimunan, kesensitifan tisu, perubahan metabolik, keupayaan fisiologi dan penyerangan penyakit spontan dan proses penuaan bagi sesetengah haiwan sepanjang tempoh kajian (kajian ketoksikan kronik boleh dijalankan melebihi satu atau dua tahun) akan mempengaruhi darjah dan keberkesanan rangsangan toksik sebenar bahan yang diuji (WHO, 1978).

2.2 HEPATOTOKSISITI DAN HEPATOPROTEKTIF

2.2.1 HATI DAN FUNGSINYA

Hati, dengan merujuk kepada perkataan Latin *hepat* (Memmler & Wood, 1987), merupakan kelenjar yang paling besar di dalam badan manusia dan beratnya mencecah 1 hingga 2.5 kg (Luciano *et al.*, 1978). Warna hati manusia adalah merah keperangan seperti warna hati haiwan lain (Memmler & Wood, 1987). Kedudukan hati berada di bawah diafragma dan di bahagian kanan atas dalam ruang abdomen. Hati terdiri daripada empat lobus. Lobus kanan dan lobus kiri merupakan lobus utama bagi hati. Lobus kanan jauh lebih besar daripada lobus kiri dan dua lagi lobus yang lebih kecil didapati terpisah daripada lobus kanan (Jacob *et al.*, 1982).

Hati merupakan organ metabolik yang paling penting dalam badan. Hati menerima darah daripada dua sumber iaitu dari vena portal dan arteri hepatic. Sebanyak 80 % daripada darah (Lamb *et al.*, 1984) yang mengalir melalui hati adalah berasal dari vena portal yang telah melalui perut, usus, pankreas, pundi hempedu dan limpa. Maka, kandungan nutrien dalamnya adalah sangat tinggi dan kepekatan oksigen pula adalah rendah. Sebanyak 20 % daripada darah yang mengandungi

kepekatan oksigen yang tinggi dari jantung, mengalir masuk ke hati melalui arteri hepatic. Sebelum darah mengalir balik ke jantung, nutrien-nutrien yang telah dimetabolikkan oleh sel-sel hati akan diserap semula ke dalam sistem pengaliran darah (Luciano *et al.*, 1978).

Organ hati memainkan banyak peranan penting dalam badan. Segala fungsi hati telah diringkaskan seperti di dalam Jadual 2.1.

Jadual 2.1 Fungsi organ hati manusia (Lamb *et al.*, 1984; Cohen & Wood, 2000; Kelly, 2004)

Fungsi Hati
Penyimpanan darah <ul style="list-style-type: none">• mengandungi lebih kurang 10 % daripada jumlah kandungan darah
Penapis darah <ul style="list-style-type: none">• menapis darah yang mengandungi bakteria dari vena portal, dari organ lain sebelum sampai ke hati• sel-sel Kupffer di dalam sinusoid hati menelan 99 % bakteria dalam darah
Penyimpanan vitamin dan zat besi <ul style="list-style-type: none">• vitamin seperti A, D, B12 yang berlebihan boleh disimpan sehingga beberapa bulan• zat besi disimpan dalam bentuk ferritin. Ferritin akan melepaskan besi ke dalam darah jika perlu
Pembentukan faktor-faktor penggumpal darah <ul style="list-style-type: none">• fibrinogen, protrombin, faktor penggumpalan darah II, VII, IX dan X
Metabolisme dan perkumuhan sesuatu ubat, bilirubin dan hormon <ul style="list-style-type: none">• hati mampu menyahtoksik dan mengkumuhkan banyak jenis ubat seperti sulfonamida, penisilin, ampicilin dan eritromisin• bilirubin, hasil akhir degradasi hemoglobin juga dikumuhkan• hormon seperti hormon tiroid, semua hormon steroid (hormon estrogen, kortisol, aldosteron dan sebagainya) dimetabolismekan
Metabolisme karbohidrat, protein dan lipid <ul style="list-style-type: none">• penyimpanan glikogen; penukaran galaktosa dan fruktosa kepada glukosa; menjalankan glukoneogenesis• diaminasi asid amino; pembentukan urea (pembuangan ammonia); pembentukan plasma protein; penukaran asid amino kepada asid amino lain dan sebatian yang diperlukan• pengoksidaan asid lemak untuk membekalkan tenaga; biosintesis kolesterol, fosfolipid dan lipoprotein; biosintesis lemak daripada protein dan karbohidrat
Penghasilan hempedu <ul style="list-style-type: none">• hati menghasilkan hempedu dengan berterusan• hempedu sangat penting dalam pencernaan dan penyerapan lipid dietari

2.2.2 HEPATOTOKSISITI

Hati memainkan satu peranan yang penting untuk melindungi badan daripada segala bahan yang masuk ke dalam badan melalui apa jua cara, sama ada dari makanan, udara, air atau faktor persekitaran. Segala bahan yang dianggap oleh badan sebagai bahan yang 'tidak diingini' akan diproses di dalam hati dan kemudiannya dikumuhkan. Proses yang dinyatakan itu adalah konjugasi dan pemusnahan. Dalam proses konjugasi, hati mencantumkan bahan yang ingin dibuang dari badan dengan molekul atau kumpulan kimia yang lain dan cantuman ini akan dikumuhkan ke dalam urin. Oleh kerana kadang-kala sebatian yang terbentuk daripada cantuman ini lebih toksik daripada sebelum pencantuman, maka, aktiviti yang sebegini adalah lebih sesuai digelar sebagai 'sintesis protektif' daripada 'penyahtoksikan'. Proses pemusnahan pula melibatkan pengoksidaan penuh bahan yang tidak diingini. Jika hanya pengoksidaan separa berlaku, maka hasil pengoksidaan separa itu akan diteruskan dengan proses konjugasi sebelum dikumuhkan (Keele & Neil, 1971; Green, 1972).

Sepanjang kehidupan seseorang manusia, faktor persekitaran, pemakanan dan gaya hidup menyebabkan kita terdedah kepada bahan-bahan toksik yang walaupun kebanyakannya tidak menyebabkan kematian dengan segera, tetapi jika kita didedahkan kepada sesuatu jangka masa tertentu, kesan buruk yang mengancam kesihatan akan diperhatikan (John & Juan, 1996). Hati, dalam keadaan sebegini, menjadi organ sasaran bagi kebanyakan bahan toksik (Mückter, 2003).

Banyak penyakit hati seperti nekrosis (kematian sel hepatosit), kolestasis (takungan hempedu), jaundis (penyakit kuning), sirosis (pengerasan hati) dan hepatitis (jenis A, B, C, D dan E) wujud disebabkan oleh kerosakan atau luka pada hati (Popper, 1977; di Bisceghe *et al.*, 1988; Lu, 1996; Zimmerman, 1998). Punca utama penyakit-penyakit hati ialah bahan kimia (nitrofurantoin, fenilbutazon, karbon tetraklorida, sulfonamida, tetrasiklin, etanol dan banyak lagi) dan virus (yang menyebabkan penyakit hepatitis) (Lieber, 1994; Lu, 1996; Edward, 2000; Mückter, 2003). Bahan-

bahan yang membawa kesan buruk kepada hati atau merosakkan hati dikenali sebagai hepatotoksin.

Pelbagai kajian *in vivo* telah dijalankan untuk menguji ketoksikan sesuatu bahan yang telah menggunakan hati sebagai organ sasaran. Misalnya, Ozmen dan Yurekli (1998) telah menguji ketoksikan sub-akut bagi uranil asetat (hasil sampingan uranium yang sering digunakan dalam industri nuklear) pada mencit. Enzim-enzim hati telah dinilai dan dibanding dengan mencit kumpulan normal bagi menentukan ketoksikannya. Dalam satu kajian lain, sobatum, sebatian tulen daripada *Solanum trilobatum*, yang mempunyai potensi menjadi agen antikanser telah dibuktikan tidak membawa sebarang kesan ketoksikan kepada semua organ dalaman mencit termasuklah hati (Mohanani & Devi, 1998).

Penyaringan sebatian aktif daripada tumbuhan ubatan tradisional atau daripada pengubahsuaian bahan kimia yang telah diketahui telah mendorong penemuan ubat baru yang memenuhi keperluan dalam bidang perubatan (Manuel *et al.*, 1993). Walaubagaimanapun, kajian ketoksikan perlu dikendalikan agar keselamatan penggunaan ubat-ubatan baru terjamin. Kanjanapothi dan rakan-rakannya (2004) telah menguji ketoksikan akut (dos tertinggi 5 g/kg bb) dan sub-akut (dos tertinggi 100 mg/kg bb untuk 28 hari) ekstrak etanol *Kaempferia galanga* pada tikus dan didapati tiada kematian diperhatikan dalam kedua-dua tempoh kajian. Piyachaturawat *et al.* (2002) telah mengkaji plorasetofenon (sejenis sebatian koleretik) secara *in vivo* pada tupai dan mencit yang teraruh-etinilestradiol, sejenis pencetus kolestasis. Kajian itu telah membuktikan bahawa plorasetofenon berupaya memperbaiki keadaan kolestasis haiwan kajian dan ketoksikannya adalah rendah.

Seperti yang telah dinyatakan sebelum ini, banyak bahan kimia adalah hepatotoksin. Karbon tetraklorida (CCl₄) merupakan satu ahli daripada kumpulan yang diklorinkan dan dibrominkan (seperti bromobenzena, klorobenzena dan kloroetana), mempunyai keupayaan yang tinggi untuk merosakkan hati (Davidson *et al.*, 1981). Maka, pelbagai penyelidikan telah dijalankan untuk mencari sesuatu bahan yang

mempunyai aktiviti anti-hepatotoksin. Berikut ialah beberapa contoh bahan-bahan yang menunjukkan aktiviti anti-hepatotoksik teraruh-CCl₄

- Oren-gedoku-to (sejenis herba Cina-Jepun yang terdiri daripada ekstrak rebusan rizom *Coptidis* sp., akar *Scutellariae* sp., kulit kayu *Phellodendri* sp. dan buah *Gardeniae* sp.) (Ohta *et al.*, 1998a)
- Ekstrak biji dan ekstrak akar *Cichorium intybus* (tumbuhan berpotensi anti-hepatotoksik) (Gadgoli & Mishra, 1997; Zafar & Ali, 1998),
- Protein CI-1 dari tumbuhan *Cajanus indicus* (Datta & Bhattacharyya, 2001),
- Monometil fumarat (sebatian yang disisihkan dari tumbuhan *Fumaria indica*) (Rao & Mishra, 1998)

Selain CCl₄, bahan kimia lain juga telah digunakan untuk mencetus kerosakan hati dalam haiwan penyelidikan. Misalnya asetaminofen (juga dikenali sebagai N-asetil-p-aminofenol, 4-asetamidofenol, 4-hidroksiasetanilida dan parasetamol) (Cohen *et al.*, 1998), lipopolisakarida (Nan *et al.*, 2004; Kang *et al.*, 2004), alkohol (Jafri *et al.*, 1999; Park *et al.*, 2002; Diehl, 2004) dan D-galaktosamina (Schümann *et al.*, 2003). β -karotin (Manda & Bhatia, 2003), ekstrak *Artemisia maritima* (Janbaz & Gilani, 1995) dan ekstrak *Cyperus scariosus* (Gilani & Janbaz, 1995) menunjukkan kesan anti-hepatotoksik teraruh-asetaminofen yang baik.

2.2.3 HEPATOPROTEKTIF

Sesetengah bahan atau sebatian bukan sahaja mempunyai aktiviti anti-hepatotoksin malah berupaya melindungi hati daripada mengalami kerosakan yang disebabkan oleh hepatotoksin. Sadasivan *et al.* (2006) telah mencadangkan bahawa mekanisme utama bagi sesuatu bahan yang dikatakan mempunyai aktiviti hepatoprotektif adalah melindungi hati daripada luka atau memulih kesan kerosakan pada sel parenkima dengan memungkinkan proses generasi semula sel hati.

Akibat kekurangan ubat perlindungan hati yang berkesan dalam bidang perubatan moden, herba terus memainkan peranan yang penting dalam rawatan pelbagai jenis penyakit hati (Trivedi & Rawal, 2000; Rajkapoor *et al.*, 2002). Kebanyakan tumbuhan ubatan tradisional yang mempunyai keupayaan merawat apa jua penyakit hati telah dikaji aktiviti hepatoprotektifnya terhadap kerosakan hati akibat hepatotoksin (biasanya CCl₄ dan asetaminofen) pada haiwan kajian. Berikut merupakan beberapa contoh ekstrak bahagian tertentu tumbuhan ubatan tradisional yang telah dibuktikan secara saintifik mempunyai aktiviti hepatoprotektif.

- *Daucus carota* (ekstrak akar) (Bishayee *et al.*, 1995)
- *Lawsonia alba* (ekstrak kulit kayu) (Ahmed *et al.*, 2000)
- *Achyrocline satureioides* (ekstrak pucuk) (Kadarian *et al.*, 2002)
- *Pistacia lentiscus* (ekstrak daun) (Janakat & Al-Merie, 2002)
- *Phillyrea latifolia* (ekstrak daun) (Janakat & Al-Merie, 2002)
- *Nicotiana glauca* (ekstrak daun dan ekstrak bunga) (Janakat & Al-Merie, 2002)
- *Thespesia populnea* (ekstrak kulit kayu) (Ilavarasan *et al.*, 2003)
- *Cynara scolymus* (ekstrak keseluruhan pokok) (Speroni *et al.*, 2003)
- *Paeonia suffruticosa* (ekstrak akar yang juga dikenali sebagai 'Moutan Cortex') (Shon & Nam, 2004)
- *Corum copticum* (ekstrak biji) (Gilani *et al.*, 2005)
- *Picrorrhiza rhizoma* (ekstrak keseluruhan pokok) (Lee *et al.*, 2006)

Beberapa jenis campuran herba perubatan tradisional Cina atau India juga telah diuji aktiviti hepatoprotektifnya secara *in vivo*. Herba-herba ini tidak digunakan secara berasingan tetapi secara bergabung. Formulasi-formulasi herba seperti Dai-saiko-to (gabungan lapan jenis herba Cina) (Ohta *et al.*, 1998b), HD-03 (satu rumusan herba India) (Mitra *et al.*, 1998) dan Yan-gan-wan (campuran lapan ekstrak herba Cina) (Yang *et al.*, 2005) juga menunjukkan kuasa sinergistik herba yang menyumbang kepada aktiviti hepatoprotektif. Unsur yang telah berjaya disisihkan daripada

tumbuhan seperti sejenis protein dengan berat molekul 43 KDa dari *Cajanus indicus* juga menunjukkan kesan perlindungan terhadap kerosakan hati (Sarkar & Sil, 2006).

Produk semulajadi telah digunakan secara meluas untuk merawat dan melindungi hati. Silimarin merupakan salah satu bahan yang kerap digunakan dalam terapi hepatic (Orhan *et al.*, 2003). Silimarin, adalah merupakan campuran flavonoligan yang telah disisihkan daripada buah dan biji tumbuhan *Silybum marianum* (Kang *et al.*, 2004). Campuran silimarin ini terdiri daripada silibin, silidianin dan silikristin (Luper, 1998). Pelbagai kajian telah membuktikan bahawa bahan ini memainkan peranan penting dalam terapi hati (sirosis) yang disebabkan oleh meminum alkohol yang berlebihan. Silimarin juga terbukti mempunyai aktiviti perlindungan hati terhadap beberapa hepatotoksin seperti CCl₄, asetaminofen dan D-galaktosamina pada model haiwan kajian yang berlainan (Schümann *et al.*, 2003).

2.3 ANTIOKSIDA

2.3.1 PENGOKSIDAAN DAN RADIKAL BEBAS

Pengoksidaan daripada segi biologi merupakan satu proses metabolisme dan penghasilan tenaga untuk memenuhi keperluan sel bagi menjalankan segala aktiviti (Chidambara Murthy *et al.*, 2002). Bahan pengoksidaan didefinisikan sebagai satu sebatian yang berkecenderungan menderma oksigen kepada bahan lain. Spesies oksigen reaktif atau ROS (*reactive oxygen species*) pula merupakan sejenis bahan pengoksidaan dan biasanya ROS merupakan radikal bebas (Langseth, 1995). Walaubagaimanapun, ROS juga wujud sebagai unsur bukan-radikal seperti hidrogen peroksida (H₂O₂), oksigen tunggal (O₂[•]), asid hipoklorous (HOCl) dan ozon (O₃) (Gyamfi *et al.*, 1999).

Radikal bebas didefinisikan oleh Fang *et al.* (2002) sebagai molekul-molekul yang mempunyai satu elektron yang tidak berpasangan di orbit luarnya. Molekul-molekul ini adalah tidak stabil dan bersedia untuk bertindak balas. Radikal-radikal

yang dijumpai dalam organisma hidup adalah seperti radikal hidroksil (OH^\bullet), radikal superoksida (O_2^\bullet), radikal nitrik oksida (NO^\bullet) dan radikal lipid peroksil (LOO^\bullet) (Jung *et al.*, 2005). Tindak balas radikal bebas akan menyebabkan pembinasaan dan pemusnahan yang tidak berbalik kepada komponen-komponen penting sel seperti lipid, protein dan DNA (asid deoksiribonukleik) (Lee *et al.*, 2004a). Mekanisme autooksidasi ini melibatkan satu tindak balas berantai yang melibatkan tiga peringkat: permulaan, perambatan dan penamatan (Bondet *et al.*, 1997). Lipid pada membran sel amat mudah dioksidakan. Pengoksidaan lipid boleh mengurangkan kelenturan membran yang mengakibatkan ketegangan pada bahagian hidrofobik membran, menurunkan peresapan membran, melemahkan proses osmosis sel dan mengubah aktiviti sesetengah enzim yang bertindak ke atas membran serta sistem pengangkutan sel (Jayaprakasha *et al.*, 2004). Perubahan dan kehilangan struktur atau fungsi binaan sel akan mengakibatkan kesan kesitotoksikan dan secara tidak langsungnya mempengaruhi kegenotoksikan yang menyebabkan kita berpenyakit (Tripathi *et al.*, 2007).

Selain pengoksidaan lipid, pengoksidaan pada protein dan DNA juga menyebabkan kerosakan pada sel. Radikal bebas mengoksidakan kumpulan sulfida protein dan pelbagai jenis asid amino. Protein selalu mengikat pada ion logam peralihan dan ini telah menyebabkannya menjadi sasaran serangan radikal hidroksil (OH^\bullet) (Hwang & Kim, 2007). Radikal bebas juga terkenal sebagai perosak DNA dan menyebabkan kesan kesitotoksikan. Radikal hidroksil (OH^\bullet) menyerang semua komponen DNA manakala radikal oksigen tunggal (O_2^\bullet) gemar menyerang nukleotida guanina (Hwang & Kim, 2007). Radikal bebas dapat mengoksidakan bes-bes DNA dan memecahkan bebenang dedua DNA (Onaran *et al.*, 2006). Kerosakan protein dan DNA mempercepatkan proses penuaan dan menyebabkan organisma hidup mudah diserang oleh penyakit-penyakit seperti kanser, reumatoid arthritis, aterosklerosis, nefritis, asma, kencing manis, penyakit neuro (penyakit Alzheimer's, Parkinson's dan Huntington's) dan sebagainya (Gyamfi *et al.*, 1999; Ju *et al.*, 2004).